

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

19



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

11 Numéro de publication:

**0 377 091
A1**

12

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

21 Numéro de dépôt: 89119479.7

51 Int. Cl.⁵: **A61K 7/48**

22 Date de dépôt: 20.10.89

30 Priorité: 28.11.88 CH 4418/88

43 Date de publication de la demande:
11.07.90 Bulletin 90/28

84 Etats contractants désignés:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

71 Demandeur: **SOCIETE DES PRODUITS NESTLE
S.A.**

**Case postale 353
CH-1800 Vevey(CH)**

72 Inventeur: **Leuba, Jean-Louis**

CH-1034 Boussens(CH)

Inventeur: **Link, Harriet**

Boulevard St-Martin 16

CH-1800 Vevey(CH)

Inventeur: **Stoessel, Peter**

Zentenarweg 2

CH-5000 Aarau(CH)

Inventeur: **Viret, Jean-Louis**

La Bruyère A Fontanivent

CH-1817 Brent(CH)

54 **Préparation cosmétique contenant du chitosane.**

57 Préparation cosmétique contenant, à titre d'agent de conservation, un chitosane présentant un poids moléculaire compris entre 3000 et 700000.

EP 0 377 091 A1

Préparation cosmétique contenant du chitosane

La présente invention a trait à une préparation cosmétique contenant du chitosane.

La littérature contient de nombreux exemples d'utilisation du chitosane.

Le chitosane peut être utilisé dans le traitement des brûlures. Par immersion ou corps brûlé dans une solution d'acétate de chitosane, on forme à la surface de la plaie un film résistant et perméable à l'oxygène, qui va faciliter la guérison.

Le chitosane est aussi connu pour posséder, sous forme de solution hydrochlorée, une bonne activité anti-infectieuse envers les bactéries, comme le montre le brevet JP 82.137930.

Le brevet JP 87.083877 mentionne l'utilisation de chitosane, de préférence dégradé par une chitonase, comme agent conservateur de divers produits.

Dans le domaine cosmétique, le chitosane est surtout connu pour être introduit dans des shampoings et des produits capillaires afin d'assurer la mise en forme et la fixation des cheveux, comme dans le brevet DE 2627419.

Le chitosane peut aussi permettre l'amélioration des propriétés lavantes et massantes d'un composé appliqué sur la peau, comme le décrit le brevet JP 86.210014.

D'une manière générale les préparations cosmétiques emballées stérilement se conservent assez bien. Toutefois, elles sont soumises à des risques de contamination tout au long de leur emploi.

Lors de l'ouverture du récipient contenant la préparation, les microorganismes contenus dans l'air ambiant peuvent la contaminer.

Puis lors de l'utilisation de la préparation, les microorganismes se trouvant à la surface de la peau peuvent aussi la contaminer. Ces contaminations peuvent entraîner une dégradation de la préparation.

La présente invention a pour but de pallier les inconvénients de l'art antérieur et de proposer une préparation cosmétique ayant de bonnes propriétés de conservation, contenant du chitosane comme agent de conservation.

A cet effet le chitosane selon la présente invention est choisi parmi ses polymères ayant un poids moléculaire compris entre 3000 et 700 000.

Un avantage de cette invention est d'utiliser comme agent de conservation un produit naturel.

Un autre avantage est d'utiliser comme agent de conservation un produit abondant et bon marché.

Un autre avantage est de n'introduire qu'une faible quantité de chitosane dans la préparation cosmétique.

Un autre avantage est d'employer un produit vis-à-vis duquel les microorganismes n'ont pas d'accoutumance. Un autre avantage est de proposer une préparation cosmétique se conservant pendant un long temps, dans un milieu stérile (emballage stérile et hermétique), ainsi que dans un milieu non stérile (emballage non hermétique ou après ouverture).

Le chitosane est obtenu par déacétylation de la chitine avec un alcali (hydroxyde de sodium ou de potassium, par exemple). La chitine est un des biopolymères les plus abondants sur terre. C'est un composant important de l'exosquelette des arthropodes, tel que la cuticule des insectes ou la carapace des crustacés, par exemple. La chitine est aussi un élément constitutif de la paroi cellulaire de certaines moisissures et levures. On suppose que l'activité biologique du chitosane est due à sa nature polycationique. Les groupes amine du chitosane, lorsqu'ils sont protonés, entrent en interaction avec les sites électronégatifs se trouvant à la surface des cellules des microorganismes.

Cette interaction entraîne une modification de la perméabilité de la membrane cellulaire qui va provoquer la fuite vers l'extérieur de certains constituants intra-cellulaires ou de certains ions. Cette perte de substances intracellulaires est associée à l'inhibition de croissance du microorganisme. D'autres mécanismes générateurs d'énergie, tels que la respiration ou la fermentation peuvent également être perturbés et / ou bloqués par l'adjonction de chitosane.

Le chitosane utilisé selon la présente invention pourra être d'origine diverse. Il pourra être notamment le produit d'une déacétylation de chitine provenant de crabes, de crevettes ou de homards par exemple.

Les propriétés physico-chimiques et la microstructure du chitosane peuvent dépendre de la source choisie, ainsi que des différents traitements apportés, tels que la purification ou la déacétylation par exemple. Le chitosane préféré selon l'invention provient de chitine extraite de crevettes.

Le degré de déacétylation du chitosane peut exercer une certaine influence sur son activité biologique. Ce degré correspond à la quantité de groupes amine libérés, de sorte que plus il est important, plus le chitosane peut être efficace.

Le degré de déacétylation du chitosane selon la présente invention est de préférence compris entre 70 et 95%.

On a constaté que la longueur des chaînes du polymère de chitosane peut influencer sur son comporte-

ment et peut entraîner des modifications de son activité biologique, autrement dit de son pouvoir d'inhibition de la croissance des microorganismes.

On a constaté, en particulier, que lorsque le chitosane se présente sous forme d'un polymère de petite taille (monomère, pentamère, heptamère, par exemple) son activité biologique est très faible.

- 5 On suppose que ceci est dû au fait que la chaîne du polymère étant trop courte, la densité de charges locales est faible, et empêche le polymère d'interagir de manière souhaitable avec les sites négatifs à la surface de la membrane de la cellule. Il n'y aurait donc pas de modification notable de la perméabilité de cette membrane.

Les chitosanes de petite taille, donc de faible poids moléculaire, ne conviennent pas comme agent de
10 conservation selon la présente invention.

Par faible poids moléculaire, on entend un poids inférieur à 3000.

- On a constaté que les chitosanes de grande taille, donc à haut poids moléculaire possèdent aussi une activité biologique faible. On suppose que cela est dû à une modification de la conformation moléculaire du chitosane. Le chitosane peut présenter une conformation allant d'un simple enroulement de nature aléatoire
15 à une structure plus compacte, quasi globulaire, cette seconde structure étant probablement favorisée dans le cas des hauts poids moléculaires.

L'interaction électrostatique entre le chitosane et la surface des cellules des microorganismes pourrait alors être limitée, du fait que la plupart des groupes actifs du chitosane seraient confinés à l'intérieur de l'édifice moléculaire et stériquement inaccessibles. Les chitosanes de grande taille, donc de haut poids moléculaire,
20 ne conviennent pas comme agent de conservation selon la présente invention.

Par haut poids moléculaire, on entend un poids supérieur à 700 000.

Le chitosane capable d'inhiber la croissance des microorganismes selon la présente invention présente donc un poids moléculaire compris entre 3 000 et 700 000, et de préférence entre 120 000 et 450 000.

- La viscosité d'une solution de chitosane étant fonction de son poids moléculaire, cette grandeur s'est
25 avérée utilisable pour caractériser une solution de chitosane utilisable dans le cadre de la présente invention.

C'est ainsi que dans un mode préféré d'utilisation du chitosane comme agent de conservation d'une préparation cosmétique, selon la présente invention, on incorpore le chitosane à la préparation cosmétique sous forme d'une solution aqueuse présentant une viscosité de 1 à 80 mPa.s pour une concentration de
30 1% de chitosane.

Le poids moléculaire du chitosane et la viscosité des solutions de chitosane sont mesurés selon les méthodes décrites à la fin de la partie générale de la description.

- La teneur en chitosane de la préparation cosmétique peut influencer sur l'activité biologique du chitosane. Une teneur trop élevée peut induire des phénomènes de répulsion entre polymères de chitosane, et
35 empêcher ceux-ci de s'approcher de la membrane cellulaire. Une teneur trop faible peut ne pas assurer une protection suffisante de la préparation vis-à-vis de la contamination microbienne.

La préparation cosmétique selon la présente invention peut présenter une teneur en chitosane comprise entre 50 et 5000 µg/g, et de préférence entre 100 et 300 µg/g.

- L'activité biologique du chitosane peut aussi dépendre de sa solubilité. Le chitosane incorporé à une
40 préparation cosmétique sous forme de poudre en suspension aqueuse peut être moins actif que sous forme de solution.

La solubilité du chitosane peut être améliorée par traitement aux ultrasons d'une dispersion de chitosane et/ou par lyophilisation après centrifugation. Le traitement aux ultrasons peut être un excellent moyen pour scinder les chaînes de polymères afin de les rendre plus solubles. Ceci amène un réarrange-
45 ment de la microstructure du chitosane, qui permet d'augmenter sa solubilité et même son activité biologique. Cette activité peut être doublée, voire même multipliée par huit lors de l'utilisation de chitosane traité aux ultrasons et/ou lyophilisé.

De plus, pour être biologiquement actif, le chitosane doit être, de préférence, dans sa forme polycationique, c'est-à-dire à un pH inférieur à son pKa, qui est de 6,2.

- 50 Afin d'assurer une grande densité de charges positives, les solutions de chitosane ont préférentiellement un pH compris entre 5,0 et 5,5.

Le chitosane pourra être incorporé à toute préparation cosmétique, telle qu'un lait, une lotion, une crème ou un gel. Il est simplement préférable que la préparation cosmétique présente une faible teneur en anions.

- 55 Afin de tester l'activité biologique des différents chitosanes, on utilise un certain nombre de microorganismes.

Ces microorganismes sont choisis parmi ceux présentant un risque pour la santé des utilisateurs ou parmi ceux susceptibles d'entraîner une détérioration de la préparation cosmétique. Parmi les nombreux microor-

ganismes répondant à ces critères, ont été choisies:

- des bactéries gram négatives (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*),
- des bactéries gram positives (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* et *Bacillus cereus*) et
- des levures (*Candida albicans*).

5

Méthodes de mesure

10 . Viscosité

La viscosité est mesurée sur des solutions à 1% de chitosane et 1% d'acide acétique, laissées au repos pendant 2 semaines afin que la viscosité se stabilise.

La mesure est effectuée à l'aide d'un rhéomètre VOR Bohlin dans les conditions suivantes:

- 15 - système de mesure: cylindre C. 14
- barre de tension: 0,24 g.cm et 19,8 g.cm
- temps d'attente initial: 60 s
- temps de la mesure: 20 s à déformation constante
- temps d'intégration: 10 s
- 20 - température: 20 °C
- vitesse de cisaillement 11,64 s⁻¹

. Poids moléculaire

25

Le poids moléculaire est mesuré par diffusion de lumière laser, selon la méthode de R.A. Muzzarelli, C. Lough et M. Emanuelli décrite dans l'article "The molecular weight of chitosans studied by laser light-scattering", publié dans Carbohydrate Res. 164, 433-442 (1987).

30

. Croissance des microorganismes

Le nombre de germes peut être déterminé de deux manières: par comptage ou par spectrophotométrie.

35

1) Comptage

Un échantillon de 1 ml est prélevé du milieu à analyser et dilué avec 9 ml d'une solution saline physiologique. On dilue de 10 en 10 cette solution, puis on place 1 ml de solution diluée sur une plaque de

40 Pétri et on mélange avec 10 ml d'agar nutritif. On laisse incuber la plaque à 37 °C pendant une nuit, puis on compte le nombre de germes qui se sont développés.

2) Spectrophotométrie

45

La méthode précédente présentant l'inconvénient d'être lente, il est plus aisé de mesurer le nombre de germes en suspension par spectrophotométrie. Une suspension de germes transmet la lumière la traversant d'une manière différente de celle d'une suspension témoin ne contenant pas de germes.

On mesure par spectrophotométrie la lumière transmise pour chaque solution, et la réduction de transmission permet de déterminer le nombre de germes en suspension. Cette mesure se fait à l'aide d'un

50 spectrophotomètre, à une longueur d'onde de 550 nm.

Toutefois, cette méthode n'est pas très sensible et ne permet de détecter qu'un nombre de germes supérieur ou égal à 10⁵ germes par ml.

55

3) *C.albicans*

En ce qui concerne cette levure, on procède par comptage microscopique, à l'aide d'une cellule de

Neubauer.

L'invention sera mieux comprise à la lecture des tests et exemples ci-après, les tests illustrant l'activité biologique in vitro de différents échantillons de chitosane. Les pourcentages sont donnés en poids, à l'exception du degré de déacétylation.

5

Tests d'activité biologique

10 Préparation d'échantillons de chitosane

On prépare différents échantillons de chitosane sous forme de milieux aqueux de culture de microorganismes contenant du chitosane en solution, de la manière suivante:

- . pour les bactéries, on prépare un milieu aqueux de CAYE contenant 1% de caséine hydrolysée, 0,5% d'extrait de levure et 0,2% de glucose
- 15 . pour la levure, on prépare un milieu aqueux YES contenant 0,5% d'extrait de levure et 2% de sucrose
- . on acidifie le milieu jusqu'à pH 2, par ajout d'acide chlorhydrique 1 N
- . on dissout divers chitosanes de diverses origines, présentant tous un degré de déacétylation compris entre 80 et 95%, dans une solution à 1% d'acide chlorhydrique de manière à obtenir une concentration en
- 20 chitosane de 1%
- . on sépare le milieu de culture en plusieurs lots auxquels on ajoute, sous agitation, le chitosane
- . le pH de chaque lot est ajusté à 5,8 par addition de soude 1 N, et le volume final est ajusté avec de l'eau distillée
- . les différents lots sont stérilisés en autoclave à 121 ° C, pendant 15 min.

25 Les échantillons témoins ne contiennent que les milieux de culture dont le pH a été ajusté à 5,8.

Les différents chitosanes testés sont classés dans le tableau ci-après par ordre de poids moléculaire et de viscosité croissants:

30

Echantillon	Poids moléculaire	Viscosité (mPa.s)
1	127925	7,85
2	135190	7,59
3	166430	13,69
35 4	193610	53,02
5	233600	50,22
6	254050	27,69
7	318890	51,48
8	351460	64,03
40 9	356400	51,85
10	437710	69,99
11	781960	82,82
12	993530	120,0
45 13	1 140 000	172,7

Préparation de cultures de microorganismes

50

Les bactéries sont cultivées pendant 8 h sur un milieu nutritif (infusion à base de veau gélosée), puis 16 h sur un milieu de CAYE à pH 5,8.

La levure est cultivée pendant 3 jours sur un milieu YES à pH 5,8.

55

La culture est ensuite diluée de telle sorte que 1 ml de culture contienne approximativement 10^7 germes.

Test No 1

Les différents échantillons de chitosane, dont la concentration est de 50 µg de chitosane par ml de milieu de culture, sont inoculés avec une suspension de germes de *Candida albicans*, de manière à obtenir un nombre initial de environ 10⁵ germes par ml.

On laisse incuber les échantillons à 23 °C sous agitation à 110 tours/min.

- 5 On mesure quotidiennement le nombre de germes dans chaque échantillon.

On note une inhibition de la croissance de *C. albicans* due au chitosane. On mesure l'intervalle de temps séparant le jour de l'inoculation de *C. albicans*, et le jour où le nombre de germes de *C. albicans* recommence à croître.

On obtient les résultats suivants: (T = témoin)

10

Echantillon	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
15 Intervalle de temps (jour)	0	28	18	25	14	14	13	12	12	15	23	3	5	3
												comparaison		

20

On remarque que l'ajout des échantillons de chitosane 1-10 permet de retarder la reprise de croissance du nombre de germes pendant une période d'au moins 12 jours.

25

Test No 2

Différents échantillons de chitosane, dont la concentration est de 100 µg de chitosane par ml de milieu de culture, sont inoculés avec des suspensions de différents organismes à raison d'un microorganisme par échantillon, de manière à obtenir un nombre initial de environ 10⁵ germes par ml.

30

On laisse incuber les échantillons à 37 °C (43 °C pour *Ps. aeruginosa*), et on note l'influence du chitosane sur la reprise de croissance des bactéries en mesurant, à intervalle régulier, le nombre de germes, par spectrophotométrie.

A titre d'illustration, le tableau ci-après donne, pour quatre échantillons de chitosane, l'évolution du pourcentage de transmission au cours de temps pour la bactérie *Staph. aureus*.

35

Le pourcentage de transmission est inversement proportionnel au nombre de germes en solution (0 signifiant que la lumière est difficilement transmise, vu le nombre très important des germes présents).

40

Echantillon	% de transmission					
	0h	6h	8h	24h	48h	120h
2	70	70	80	91	93	7
4	46	46	46	46	63	7
5	61	68	68	74	64	7
9	91	91	91	91	82	7
45 Témoin	100	70	25	7	7	7

50

Le pourcentage de transmission initial est différent selon les échantillons testés. Ceci est dû à l'apparition d'une légère turbidité dans la solution, due à une interaction entre le chitosane et le milieu de culture. Toutefois cette turbidité restant constante au cours du temps, elle n'influe pas sur le tracé général des courbes d'évolution.

Pour chaque bactérie testée, les échantillons de chitosane ont été classés en fonction de la durée de leur pouvoir d'inhibition.

55

- *Staph. aureus*
- . au moins 8 h: 1
- . au moins 24 h: 3-6-7-8-10
- . au moins 48 h: 2-4-5-9

- Strep. faecalis
 - . au moins 6 h: 11-12 (comparaison)
 - . au moins 8 h: 3-7-10
 - . au moins 48 h: 2-4-5-6-8-9
- 5 - B. cereus
 - . au moins 24 h: 6-7-8
 - . au moins 96 h: 1-2-3-4-5-9-10
- E. coli
 - . au moins 6 h: 9
- 10 - Ps. aeruginosa
 - . au moins 8 h: 2-4
 - . au moins 10 h: 3-4-10
 - . au moins 14 h: 2-5-9

On peut conclure de ce test que les échantillons de chitosane 1-10 testés inhibent de façon appréciable la croissance des bactéries.

Test No 3

On procède de manière semblable à celle décrite au test No 2, à l'exception du fait que l'on utilise des échantillons de chitosane dont la concentration est de 200 µg de chitosane par ml de milieu de culture et que l'on détermine le nombre de germes par comptage.

Les tableaux suivants montrent l'évolution du nombre de germes par ml au cours du temps, pour différents échantillons de chitosane et pour différents microorganismes.

ND = non déterminable

- Streptococcus faecalis					
Initialement: 2,6.10 ⁵ germes par ml					
Nombre de germes par ml					
Echantillon	4h	8h	24h	48h	144h
1	3,1.10 ⁴	2200	10 ⁶	>10 ⁷	5,6.10 ⁶
2	1800	4,6.10 ⁴	2.10 ⁴	66.10 ⁴	5,6.10 ⁶
3	93	26	120	290	5,5.10 ⁶
8	20	50	1,4.10 ⁶	>10 ⁷	58.10 ⁴
Témoin	45.10 ⁶	2.10 ⁸	2,8.10 ⁸	ND	ND

- Staphylococcus aureus						
Initialement: 8,1.10 ⁵ germes par ml						
Nombre de germes par ml						
Echantillon	4h	8h	24h	48h	72h	168h
1	6200	3100	55.10 ⁴	12.10 ⁴	49.10 ⁴	>10 ⁷
2	400	43	28.10 ⁴	2,4.10 ⁵	3,6.10 ⁵	>10 ⁷
3	12.10 ⁴	2	5,8.10 ⁴	12.10 ⁴	10 ⁵	6300
8	100	100	16.10 ⁴	17.10 ⁴	5,7.10 ⁴	9,2.10 ⁴
Témoin	17.10 ⁶	58.10 ⁶	10 ⁸	ND	ND	ND

- Bacillus cereus					
Initialement: $9,1 \cdot 10^5$ germes par ml					
Nombre de germes par ml					
Echantillon	4h	8h	24h	48h	120h
1	7	4	0	0	0
2	0	0	$39 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^4$
3	8	2	1	0	0
8	1	0	0	0	$1,2 \cdot 10^6$
Témoïn	$11 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^6$	ND	ND

- Pseudomonas aeruginosa				
Initialement: $8,1 \cdot 10^5$ germes par ml				
Nombre de germes par ml				
Echantillon	4h	8h	24h	48h
1	$27 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^6$	$> 10^7$	ND
2	6200	1600	9800	$2,1 \cdot 10^6$
3	7300	3400	$7,7 \cdot 10^4$	$> 10^7$
8	$34 \cdot 10^4$	$63 \cdot 10^4$	$> 10^7$	ND
Témoïn	$19 \cdot 10^6$	$36 \cdot 10^6$	$> 10^9$	ND

- E. coli			
Initialement: $1,6 \cdot 10^5$ germes par ml			
Nombre de germes par ml			
Echantillon	4h	8h	24h
1	6600	$1,2 \cdot 10^6$	$> 10^8$
2	$1,8 \cdot 10^4$	$> 10^7$	$> 10^8$
3	6400	$1,2 \cdot 10^6$	$> 10^8$
8	$36 \cdot 10^4$	$> 10^7$	$> 10^8$
Témoïn	$6,3 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^9$

45 Durant les quatre ou même huit premières heures d'incubation, le nombre de germes présents dans les échantillons contenant du chitosane diminue de façon significative.

Ce nombre tend ensuite à retrouver sa valeur initiale, et même à la dépasser. Ceci montre que les échantillons contenant du chitosane ont une activité bactériostatique vis-à-vis des microorganismes testés, et ceci sur des périodes allant de 4 heures (E. coli) à 48 heures (St. faecalis et St. aureus).

50 On remarque aussi que les échantillons 1 et 3 ont une activité bactéricide vis-à-vis de la bactérie B. cereus.

Ces trois tests montrent bien que des échantillons de chitosane ayant un poids moléculaire compris entre 3000 et 700 000 ont une activité bactériostatique, voire bactéricide, vis-à-vis des microorganismes.

55 Test No 4

On prépare, à partir de chitosane ayant approximativement un poids moléculaire de 128 000, plusieurs échantillons de concentrations différentes, s'échelonnant de 50 g à 5000 μ g de chitosane par ml de milieu.

Ces échantillons sont inoculés avec une suspension de *C. albicans* de manière à obtenir un nombre initial de environ 10^5 germes par ml, puis chaque échantillon est réparti dans plusieurs tubes en verre, stériles qui sont ensuite fermés hermétiquement.

On laisse incuber à 23°C dans l'obscurité, pendant 6 mois. A intervalle de temps régulier, on ouvre un tube pour chaque concentration et l'on mesure le nombre de germes présents.

Pour chaque concentration, on obtient une durée pendant laquelle le chitosane est actif et inhibe la croissance des germes présents.

Pour les échantillons contenant $250\text{ }\mu\text{g}$ et plus de chitosane par ml, la croissance des germes est inhibée pendant une durée minimale de 6 mois. En effet, on ne détecte aucune croissance de germes dans ces tubes.

Pour l'échantillon contenant $50\text{ }\mu\text{g}$ de chitosane par ml, la croissance des germes est inhibée pendant 5 semaines, puis reprend ensuite.

A titre de comparaison, pour un échantillon contenant $20\text{ }\mu\text{g}$ de chitosane par ml, la croissance des germes n'est inhibée que pendant 1 jour.

Le chitosane peut donc rester actif pendant de longues périodes, s'il est en concentration suffisante.

Test No 5 (test comparatif)

Afin de pouvoir étudier l'activité des chitosanes de faible poids moléculaire, on hydrolyse partiellement 5 g de chitosane, avec HCl concentré, pendant 21 h à 53°C . Le chitosane résultant est séché sous vide à 30°C , et les différents oligomères sont séparés grâce à une résine échangeuse d'ions (AG 50 W - X 8), l'éluant utilisé étant l'acide chlorhydrique, de concentration variant de 1 à 5,5 N. Les différentes fractions d'éluat sont séparées par filtration sur gel (Fractogel TSK HW - 40) l'éluant utilisé étant une solution à 0,2% d'acide formique. Les différents oligomères sont identifiés par chromatographie sur couche mince.

On teste l'activité antimicrobienne du pentamère et de l'heptamère de glucosamine, selon la méthode décrite dans le test No 4, à l'aide de la levure *C. albicans*, et ce pour différentes concentrations en chitosane.

On ne remarque aucune inhibition de la croissance de la levure pour une concentration de 1 mg de chitosane par ml de milieu de culture (soit $1000\text{ }\mu\text{g/g}$).

Exemple 1

Dans 600 ml d'eau distillée on disperse 10 g de chitosane présentant un poids moléculaire de environ 180000, un degré de déacétylation de environ 85% et provenant de crevettes. On ajoute 30 ml d'acide acétique, et on dissout le tout par agitation. On ajuste le pH à 5,8 par ajout de soude, et on ajuste le volume de la solution à 1 litre par addition d'eau distillée.

On prépare parallèlement quatre lots de lait de toilette, contenant 6% d'ester alkylique en $\text{C}_{12}\text{-C}_{18}$ de polyéthylène glycol, 5% de stéarate de glycérol, 3% de laurate d'isodécyl, 3% de triglycérides d'acides gras en $\text{C}_{10}\text{-C}_{18}$, 1% d'alcool cétylique, 0,8% de diméthicone, (huile de silicone), 0,4% d'hydroxyéthylcellulose, 3% de sorbitol à 70% et 0,2% de parfum.

On réserve un lot comme témoin et l'on ajoute à chacun des trois autres lots quelques ml de solution de chitosane de manière à obtenir quatre lots présentant des teneurs respectives en chitosane de 0, 50, 100 et $200\text{ }\mu\text{g/g}$.

On ajuste le pH à 6 et l'on complète à 100% avec de l'eau distillée.

On inocule les lots avec une suspension de microorganismes de manière à obtenir un nombre initial de environ 10^4 germes par ml.

Les lots sont conservés à température ambiante et à l'abri de la lumière.

On mesure le nombre de germes présents dans le lait de toilette à différents stades de l'évolution: après l'inoculation, après une semaine, après deux semaines, après trois semaines et après quatre semaines.

Les microorganismes choisis sont:

- I. *E. coli*
- II. *Ps. aeruginosa*
- III. *Staph. aureus*
- IV. *Strep. faecalis*
- V. *C. albicans*

On obtient les résultats présentés dans le tableau suivant.

Microorganismes	I	II	III	IV	V
Après inoculation					
Lot A (témoin)	34.10 ³	8.10 ⁴	42.10 ⁴	7.10 ⁴	36.10
Lot B (50 µg/g)	35.10 ³	10	18.10 ³	7.10 ⁴	9.10 ³
Lot C (100 µg/g)	29.10 ³	10	6.10 ⁴	53.10 ³	9.10 ³
Lot D (200 µg/g)	24.10 ³	10	27.10 ³	24.10 ³	80
Après 1 semaine					
Lot A	3.10 ⁷	16.10 ⁵	10 ⁴	3500	3.10 ⁶
Lot B	10	10	10	10	10
Lot C	10	10	10	10	10
Lot D	10	10	10	10	10
Après 2 semaines					
Lot A	13.10 ⁶	10 ⁶	500	20	10 ⁶
Lot B	-	-	-	-	10
Lot C	-	-	-	-	10
Lot D	-	-	-	-	10
Après 3 semaines					
Lot A	6.10 ⁵	48.10 ⁵	60	50	8.10 ⁶
Lot B	-	-	-	-	10
Lot C	-	-	-	-	10
Lot D	-	-	-	-	10
Après 4 semaines					
Lot A	5.10 ⁶	10 ⁷	50	10	9.10 ⁶
Lot B	-	-	-	-	10
Lot C	-	-	-	-	10
Lot D	-	-	-	-	10

On remarque que tous les laits contenant du chitosane inhibent la croissance des bactéries ou levures qu'ils contiennent. L'effet est visible dès la première semaine.
L'activité bactériostatique voire bactéricide du chitosane est nette, même en ce qui concerne les laits à faible teneur en chitosane (50 µg/g).

Exemple 2

Une crème cosmétique contenant du chitosane est préparée de la manière suivante:

- on prépare 77 ml d'une solution tampon à pH 5,7 (à base de phosphate de sodium),
- on y ajoute 10 mg de chitosane, dissout dans de l'acide acétique dilué, présentant un poids moléculaire de environ 180000, un degré de déacétylation de environ 85% et provenant de crevettes,
- on ajoute ensuite 8 g de glycérol, puis le mélange est chauffé au bain-marie à 80 °C,
- parallèlement, on fait fondre 15 g de stéarate de glycérol à 80 °C, qu'on ajoute lentement au mélange précédent, sous agitation,
- on laisse le mélange se refroidir jusqu'à température ambiante, en l'homogénéisant de temps à autre.

On obtient une crème contenant 100 µg/g de chitosane. De la même manière, on prépare une crème contenant 250 µg/g de chitosane.

Des crèmes témoins, sans ajout de chitosane, sont aussi préparées.

Les différentes crèmes sont placées dans des pots non stérilisés, et gardées à température ambiante, dans l'obscurité. Des signes de contamination apparaissent au bout de 2 mois sur les témoins. Un examen microscopique révèle l'apparition graduelle de spores et d'hyphes de champignons.

Les crèmes contenant du chitosane ne présentent aucune trace de contamination, même au bout d'un an.

Revendications

1. Préparation cosmétique contenant du chitosane, caractérisée en ce que le chitosane a un poids moléculaire compris entre 3000 et 700 000.
- 5 2. Préparation cosmétique selon la revendication 1, caractérisée en ce que le chitosane a un poids moléculaire compris entre 120000 et 450000.
3. Préparation cosmétique selon la revendication 1, caractérisée en ce que le chitosane a un degré de déacétylation compris entre 70 et 95%.
4. Préparation cosmétique selon la revendication 1, caractérisée en ce que sa teneur en chitosane est
10 comprise entre 50 et 5000 µg/g.
5. Préparation cosmétique selon la revendication 1, caractérisée en ce que le chitosane provient de la crevette.
6. Utilisation du chitosane comme agent de conservation d'une préparation cosmétique, caractérisée par le fait que l'on incorpore à la préparation cosmétique un chitosane présentant un poids moléculaire
15 compris entre 3000 et 700 000.
7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée par le fait que l'on incorpore un chitosane présentant un poids moléculaire compris entre 120000 et 450000.
8. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée par le fait que l'on incorpore un chitosane présentant un degré de déacétylation compris entre 70 et 95%.
- 20 9. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée par le fait que l'on incorpore 50 à 5000 µg de chitosane par g de préparation cosmétique.
10. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée par le fait que l'on incorpore le chitosane sous forme d'une solution aqueuse présentant un pH inférieur à 6,2.
11. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée par le fait que l'on incorpore le chitosane sous
25 forme d'une solution aqueuse présentant un pH de 5,0-5,5.
12. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée par le fait que l'on incorpore le chitosane sous forme d'une solution aqueuse contenant 1% de chitosane et présentant une viscosité comprise entre 1 et 80 mPa.s.
13. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée par le fait que l'on incorpore le chitosane sous
30 forme d'une poudre en suspension aqueuse.
14. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée par le fait que l'on incorpore le chitosane sous forme d'une poudre obtenue par mise en dispersion aqueuse du chitosane, traitement aux ultrasons de la dispersion, centrifugation et lyophilisation.

35

40

45

50

55



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 89 11 9479

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
D,X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, vol. 11, no. 290 (C-447)[2737], 18 septembre 1987, page 70 C 447; & JP-A-62 083 877 (KATAKURA CHITSUKARIN K.K.) 17-04-1987 * Résumé *	1-14	A 61 K 7/48
P,X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, vol. 13, no. 115 (C-578)[3463], 20 mars 1989, page 131 C 578; & JP-A-63 290 808 (NITTA ZERACHIN K.K.) 28-11-1988 * Résumé *	1-14	
A	EP-A-0 161 212 (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE) * Revendications; page 5, ligne 19 - page 6, ligne 7; exemples 5,6 *	1-14	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
			A 61 K
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lien de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 24-04-1990	Examineur WILLEKENS G.E.J.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

EPO FORM 1503 01.82 (P0402)